

# 生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph.D.

## 1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは *de novo* には作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成する 1000 種類を超えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

## 2. 本年度の研究成果

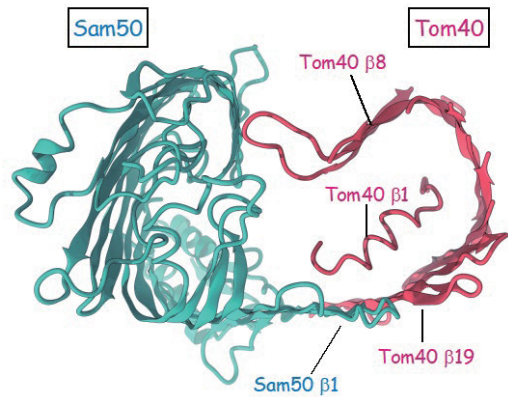
### (1) ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体による $\beta$ -バレル構造形成の分子機構

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するポリンや Tom40 などバレル型構造の膜タンパク質（ $\beta$  バレル型膜タンパク質）が存在し、ミトコンドリアの機能に必須である。SAM 複合体はこれらのタンパク質の  $\beta$  バレル構造形成と外膜へ私たちは、SAM 複合体の構成サブユニットが異なる二つの複合体について、高分解能立体構造を決定し、SAM 複合体がそのサブユニットと基質の  $\beta$  バレルタンパク質を入れ替えながら、基質のバレル構造形成を促し、外膜に組み込む新規の仕組み（ $\beta$  バレルスイッチモデル）を明らかにした (Takeda *et al.*, *Nature* 2021)。しかし、基質がどのように  $\beta$  シートを折り曲げて正確にバレル構造に組み上げるのかについては不明であった。今回、SAM 複合体と構造形成途上にある基質 Tom40 の複合体のクライオ電子顕微鏡構造を 2.8 Å の空間分解能で決定した (Takeda *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2023)。さらに *in vivo* で  $\beta$  バレル構造形成時の基質の  $\beta$  シート形成と Sam50-基質間および基質内の一過的相互作用を、ジスルフィド結合形成を指標としてモニターする実験系を確立し、バレル構造形成の解析を行った。SAM 複合体の Sam50 の  $\beta 1$  ストランドと基質 Tom40 の  $\beta 19$  ストランドが  $\beta$  シートを作り、N 端側に向かって  $\beta 8$  ストランドまで  $\beta$  シートが形成されていた。 $\beta 1$ - $\beta 7$  ストランドは構造が十分には見えなかったが、 $\beta 1$  は以外にも途中まで形成された  $\beta$  バレルの内部に入り込みヘリックス構造を作っていた。この後  $\beta$  バレル形成が進むと  $\beta 1$  よりも前にある 80 残基程度の N 端セグメントが  $\beta 1$  を追い出し、 $\beta 1$  は  $\beta 19$  と  $\beta$  シートを形成して  $\beta$  バレル構造が完成すると考えられる。すなわち、基質の  $\beta$  バレルが構造正しく形成されるためには、C 端側からの  $\beta$  シートの成長、バレル形成の途中でシートを大きく曲げることで、最終的に C 端側  $\beta$  ストランドと  $\beta$  シートを形成してバレルを閉じるために N 端側の  $\beta$  セグメントとなる部分を形成途上のバレル内にいったん呼び込むことが必要であることがわかった。これは、細菌の BAM 複合体による  $\beta$  バレルタンパク質の構造形成とは全く異なるメカニズムであり、進化的にどのように獲得されたか、など興味深い。

### (2) オルガネラに誤配送された膜タンパク質の配送やり直しの分子機構

真核細胞のオルガネラが正しく機能するためには、各オルガネラの機能を担うタンパク質が正しくオルガネラに配送されることが必要である。これまでオルガネラタンパク質はその局在化シグナルにしたがって正確に目的地に輸送される、そして万一輸送に失敗した誤配送タンパク質は速やかに分解されると考えられてきた。しかし

私たちは最近、タンパク質の細胞内輸送は必ずしも正確ではなく、確率的に誤局在が起こりうる、しかしそうした誤局在タンパク質を見出し、単に分解するだけでなく配送のやり直し、いわば「配送の校正」を行うことで、最終的に正しいタンパク質の局在化を実現するシステムが存在することを見出した (Matsumoto and Endo, *J. Biochem.* 2023)。すなわちミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送された膜タンパク質を検出して引き抜き、ER 膜に送り込んで分解するか配送をやり直すかが決まることを見出した (Matsumoto, Ono *et al.*, *JCB*, 2022)。それではこうしたタンパク質の配送の校正は他のオルガネラでも起こるのか？本研究では、ER に誤配送されたミトコンドリア外膜タンパク質の ER 膜からの引き抜きと品質管理に ER 膜の P-type ATP アーゼ Spf1 が関わる可能性について検討した。まず、Spf1 欠損酵母細胞ではミトコンドリア外膜の TA タンパク質や一部の N アンカータンパク質が ER に誤局在することを見出した。さらに誤配送基質の発現をオフにしてから Spf1 の発現を誘導すると、誤配送されたミトコンドリア外膜タンパク質が ER から減少し、ミトコンドリアへの局在が回復することを見出した。これらの局在の変化は Spf1 欠損に伴う ER ストレス誘導やエルゴステロールのオルガネラ間分布の変化による二次的影響に由来するものではないことを確認した。これらの結果は Spf1 がミトコンドリアと ER 間での膜タンパク質の正しい局在化の実現に関わることを強く示唆するものと考えられる。



SAM 複合体と Tom40 のフォールディング中間体との複合体のクライオ電顕構造

### 3. Research projects and annual reports

#### This year's accomplishments

#### 1) Molecular mechanism of $\beta$ -barrel protein folding by a mitochondrial outer membrane translocator, the SAM complex.

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking.

The mitochondrial outer membrane houses membrane proteins characterized by barrel-like structures, known as  $\beta$ -barrel membrane proteins. These proteins, such as porins and Tom40, play a crucial role in facilitating the passage of small molecules and proteins, thereby contributing to mitochondrial function. The SAM complex in the mitochondrial outer membrane is a translocator responsible for the formation of the  $\beta$ -barrel structure of these proteins and their incorporation into the outer membrane. We have previously determined the high-resolution structures of the two forms of the SAM complex, each of which contains different subunit proteins, and revealed a novel mechanism ( $\beta$ -barrel switch model) in which the SAM complex switches its subunits with the  $\beta$ -barrel protein substrate to promote its formation of the  $\beta$ -barrel structure and its insertion into the outer membrane. (Takeda *et al.*, *Nature* 2021). Nonetheless, it still remained unclear how the substrate folds the  $\beta$ -sheet and assembles it into a precise barrel structure, closing the sheet. In this study, we determined the cryo-EM structure of the SAM complex with a folding intermediate of the substrate Tom40 at a spatial resolution of 2.8 Å (Takeda *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2023). Furthermore, we established an experimental system to monitor  $\beta$ -sheet formation of the substrate and its transient interaction with Sam50 as well as within Tom40 during  $\beta$ -barrel formation *in vivo*, using disulfide bond formation as an indicator for analysis of barrel structure formation. In summary, the structurally correct formation of the substrate's  $\beta$ -barrel

requires the growth of the  $\beta$ -sheet from the C-terminal side, significant bending of the sheet during barrel formation, and the involvement of the N-terminal  $\beta$ -segment inside the forming barrel, ultimately leading to the closure of the barrel. This mechanism differs entirely from the process by which bacterial BAM complexes form  $\beta$ -barrel proteins. The evolutionary acquisition of this mechanism is an intriguing aspect worth exploring further.

## **2) Molecular mechanism of re-transport of mislocalized organelle proteins.**

For eukaryotic cell organelles to function properly, the proteins responsible for the function of each organelle must be correctly delivered to the organelle. It has been believed that organelle proteins are precisely transported, and that mislocalized proteins are quickly degraded. However, we have recently found that intracellular transport of proteins is not always precise and that mislocalization can occur stochastically, but that there exists a system that detects such mislocalized proteins and not only degrades them but also re-transport them, so to speak, by "proofreading of protein transport" to finally achieve correct protein localization (Matsumoto and Endo, *J. Biochem.* 2023). Msp1, an AAA-ATPase in the mitochondrial outer membrane, detects and extracts mislocalized membrane proteins from the mitochondrial outer membrane, which are then transported to the ER membrane for degradation or re-transport (Matsumoto, Ono et al., *JCB*, 2022). Then, an important question is if such proofreading of protein transport could operate in other organelles. In this study, we investigated the possibility that the ER P-type ATPase Spf1 is involved in the quality control and extraction of mitochondrial outer membrane proteins mislocalized to the ER from the ER membrane. First, we found that mitochondrial outer membrane tail-anchored (TA) proteins and some N-anchored proteins are mislocalized to the ER in Spf1-deficient yeast cells. We also found that when Spf1 expression was induced after the expression of the mislocalized substrates was turned off, the mislocalized mitochondrial outer membrane proteins decreased from the ER and their localization to mitochondria was restored. We confirmed that these changes in localization were not due to secondary effects of Spf1 deficiency-induced ER stress or changes in the inter-organelle ergosterol distribution. These results strongly suggest that Spf1 is involved in achieving correct localization of membrane proteins between mitochondria and the ER.

## 4. 論文, 著書など

### 原著論文

Matsumoto S, Ono S, Shinoda S, Kakuta C, Okada S, Ito T, Numata T, Endo T, GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. *J. Cell Biol.* 221, e202104076 (2022).

Kakimoto-Takeda Y, Kojima R, Shiino H, Shinmyo M, Korokawa K, Nakano A, Endo T, Tamura Y, Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress. *iScience* 25(11):105362 (2022).

Takeda H, Busto JV, Lindau C, Tsutsumi A, Tomii K, Imai K, Yamamori Y, Hirokawa T, Motono C, Ganesan I, Wenz, L-S, Becker T, Kikkawa M, Pfanner N, Wiedemann N, Endo T, A multipoint guidance mechanism for  $\beta$ -barrel folding on the SAM complex. *Nat Struct Mol Biol* 30, 176-187 (2023).

Akabane S, Watanabe K, Kosako H, Yamashita S-I, Nishino K, Kato M, Sekine S, Kanki T, Matsuda N, Endo T, Oka T, TIM23 facilitates PINK1 activation by safeguarding against OMA1-mediated degradation in damaged mitochondria. *Cell Rep.* 42, 11254 (2023).

## 英文総説

Hirashima T and Endo T (News and Views), A protein entry path into chloroplasts. **Nature** 615, 222-224 (2023).

Araiso Y and Endo T (Review), Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex. **Biophys. Physiol.** e190022 (2022).

Araiso Y, Imai K, Endo T (Review), Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. **Ann. Rev. Biochem.** 91, 679-703 (2022).

Matsumoto S and Endo T (Review), Proofreading of protein localization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1. **J. Biochem.** 173, 265-271 (2023).

## 日本語解説記事

遠藤斗志也, 荒磯裕平, 竹田弘法, ミトコンドリアタンパク質の膜透過と膜組込機構. **医学のあゆみ** 281 (12), 1151-1156 (2022).

遠藤斗志也, 竹田弘法, 荒磯裕平, ミトコンドリアタンパク質の輸送機構. **実験医学** 41 増刊「ミトコンドリア：疾患治療の新時代」, 664-675 (2023).

## 5. 学会発表など

(招待講演)

松本竣介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型タンパク質の配送校正機構, 第22回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ「細胞内タンパク質世界の新視点」, つくば2022.6.7-9, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Protein machineries that make and maintain mitochondria, Mitochondria and Friends 2.0: Scientific Symposium Dedicated to the Memory of Walter Neupert, Munich, 2022.6.27, 海外, 口頭

Toshiya Endo, Protein machineries in transport and re-transport of mitochondrial proteins (Invited lecture -Closing talk), EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21, 海外, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, 膜タンパク質局在化における配送校正機構の解明 (2022年度日本生化学会奨励賞受賞講演), 第95回日本生化学会大会, 名古屋, 2022.11.9-11, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Pathways and machineries that mediate and regulate mitochondrial protein trafficking (Invited), ISF Workshop: Mitochondria Past and Present - Evolution, Proteostasis, Dynamics and Disease, Kibbutz Ein Gedi, Dead Sea, Israel 2022.11.13-16, 海外, 口頭

遠藤斗志也, タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの解明, タンパク質研究シンポジウム, 東京, 2022.12.12-13, 国内, 口頭

(一般発表)

川上航平, 後藤美稀, 遠藤斗志也, 田村康, ミトコンドリアの存在量を調節する分子機構の解明, 日本生化学会東北支部第88回例会, 鶴岡, 2022. 5. 27, 国内, ポスター発表

椎野浩也, 橋本美智子, 細谷孝充, 遠藤斗志也, 田村康, リン脂質合成輸送阻害剤を用いたミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質輸送機構の解析, 日本生化学会東北支部第88回例会, 鶴岡, 2022. 5. 27, 国内, ポスター発表

小西雄大, 阪上春花, 竹田弘法, 遠藤斗志也, 酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼHfd1の細胞内局在の分子機構, 第68回日本生化学会近畿支部例会 大津 (ハイブリッド) 2022.5.28, 国内, 口頭

九笹加菜, 小林菜々子, 今井大達, 榎野愛実, 稲津明広, 古寺哲幸, 遠藤斗志也, 荒磯裕平, 高速原子間力顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の構造とダイナミクス, 第22回日本蛋白質科学会年会, つくば, 2022. 6.7-9, 国内, 口頭

小西 雄大、阪上春花、竹田弘法、遠藤斗志也，コエンザイムQ合成経路におけるER局在型の酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼHfd1の関与，第74回日本細胞生物学会大会，東京都江戸川区，2022.6.28-30，国内，口頭

篠田沙緒里、坂本智昭、木村成介、遠藤斗志也，ミトコンドリアに輸送される新規核コードRNAの網羅的探索，第74回日本細胞生物学会大会，東京都江戸川区，2022.6.28-30，国内，口頭

Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo, Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria, 第23回日本RNA学会年会，京都，2022.7.20-22，国内，口頭

Haruka Sakaue, Toshiya Endo, Analysis of the import regulatory mechanism of mitochondrial IMS protein, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

Suzuka Ono, Shunsuke Matsumoto, Toshiya Endo, Membrane protein quality control in mitochondria and the ER by Msp1 and Spf1, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo, Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

平嶋孝志，齊藤知加，河野 慎，遠藤斗志也，小胞体-ミトコンドリア間接触部位を形成する酵母ERMES複合体の最小機能単位，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，口頭+ポスター発表

阪上春花，遠藤斗志也，出芽酵母におけるミトコンドリア膜間部タンパク質のインポート調節機構，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，口頭+ポスター発表

椎野浩也，橋本美智子，細谷 孝充，遠藤斗志也，田村 康，リン脂質合成輸送阻害剤を用いたミトコンドリア・小胞体間における新規リン脂質輸送因子の探索，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，ポスター発表

小野鈴花，遠藤斗志也，Spf1が調節するミトコンドリア-ER間における膜タンパク質の再配送機構，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

小西雄大，阪上春花，竹田弘法，遠藤斗志也，細胞内多重局在タンパク質Hfd1とTOM複合体の相互作用形態の探索，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

赤羽しおり，渡邊聖菜，小迫英尊，松田憲之，遠藤斗志也，岡敏彦，ミトコンドリア膜透過装置TIM23はPINK1複合体のメンバーとして、脱分極で誘導されるPINK1分解を抑制する，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

小林菜々子，九笹加菜，今井大達，川合志朋，槇野愛実，稲津明広，古寺哲幸，遠藤斗志也，荒磯裕平，ミトコンドリア膜透過装置TOM複合体の高速原子間力顕微鏡解析，第45回日本分子生物学会年会 幕張，千葉 2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

篠田沙緒里，坂本智昭，木村成介，遠藤斗志也，ミトコンドリアへ輸送される核コードRNAの探索技術の開発と生理学的意義の解析，第21回日本ミトコンドリア学会年会，東京，2023.3.16-18，国内，口頭

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 (S)

課題名：ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの分子基盤

研究代表者：遠藤斗志也，取得年度：2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・学術変革領域研究 (A)

課題名：細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

研究代表者：遠藤斗志也，取得年度：2020-2024 年度 (5 年)

AMED・CREST

課題名：タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの構造生物学研究

研究代表者：遠藤斗志也，取得年度：2020-2025 年度（6 年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア外膜上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者：篠田沙緒里，取得年度：2019-2022 年度（3 年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア膜間部タンパク質の外膜透過における分子機構の解明

研究代表者：阪上春花，取得年度：2020-2022 年度（3 年）

私立学校振興共済事業団 女性研究者奨励金

ATPase を介したタンパク質配送校正機構の解明

研究者：小野鈴花，取得年度：2022 年度（1 年）

## 2) 学外活動

遠藤斗志也：日本学術会議連携会員

遠藤斗志也：日本細胞生物学会代議員

遠藤斗志也：日本細胞生物学会常任編集委員

遠藤斗志也：JST-CREST「細胞内現象の時空間ダイナミクス」研究総括

## 3) アウトリーチ活動

篠田沙緒里，張春明：【宮城県仙台第一高校 ラボツアー】

実施日時：2022 年 7 月 7 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：研究内容の紹介および研究室ツアーを行った。研究員立ち会いのもと，実際に顕微鏡操作を体験しながらヒト培養細胞のミトコンドリアの観察を行った。またタンパク質構造解析に関する一連の過程についても説明を行った。

篠田沙緒里：【井出庸生文部科学副大臣への研究室紹介】

実施日時：2022 年 9 月 28 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：井出庸生文部科学副大臣に対し，研究室の紹介および研究室の案内を行った。若手研究者の現状についても説明を行った。見学後に副大臣の SNS でも当研究室を見学されたことが報告されていた。

張春明，草野清輔：【鹿児島県立甲南高等学校 ラボツアー】

実施日時：2022 年 12 月 7 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：来館した鹿児島県立甲南高等学校の生徒に対し，研究内容の紹介および研究室ツアーを研究員より行った。ラボツアーについては，研究対象であるミトコンドリアをマクロ（細胞）とミクロ（分子）という 2 つの視点で捉え，理解を深めてもらうことを目的とした。

篠田沙緒里：【私立北鎌倉女子学園高等学校出張授業】

実施日時：2023 年 1 月 20 日

場所：神奈川県 私立北鎌倉女子学園高等学校

内容：理系クラス高校 2 年生に向けて研究者という職業および，自身の研究を紹介する授業(60 分)を行った。その後パネルディスカッションを行い生徒と対談した。2021 年度から行なっている出張授業のため，去年の経験を活かして授業を行った。



2023年9月 遠藤研リトリート（山形県天童市）